

KIVONAT

PHARMACAL BIOTECHNOLOGIES, INC., Westlake Village, Cal. (US)

Feltaláló: BUDNY, John A., Westlake Village, Cal. (US)

A találmány tárgya olyan készítményekre vonatkozik, melyek meggátolják baktérium telepek képződését, különösen de nem korlátozva szájüregben való alkalmazásra fog lepedék csökkentésére. A találmány vonatkozik továbbá a szájüreg terápiás kezelésére, mely megállítja vagy visszасzorítja a baktérium telepek kiterjedését a szájüregben, csökkentve ezzel a fog lepedékek mennyiségét.

A baktérium telep sejtburjánzását és az íny szövetre való kiterjedését is meg lehet akadályozni enzimekkel szabályozva a lepedékszerkezetek kiterjedését vagy méretét. A találmány ezen készítmények előállítási módszereire is vonatkozik.

Jellemző az 1. ábra.

df 187

2001.02.14.

P0100016

31909

PCT/US98/21656 Képviselő: PINTZ György szabadalmi ügyvivő, Budapest

PHARMACAL BIOTECHNOLOGIES, INC., Westlake Village, Cal. (US)

Feltaláló: BUDNY, John A., Westlake Village, Cal. (US)

A bejelentés napja: 2000. 04. 13.

Az elsőbbség napja: 1997. 10. 16.

A találmány tárgya olyan készítményekre vonatkozik, melyek meggátolják baktérium telepek képződését, különösen de nem korlátozva szájüregben való alkalmazásra fog lepedék csökkentésére. A találmány vonatkozik továbbá a szájüreg terápiás kezelésére, mely megállítja vagy visszaszorítja a baktérium telepek kiterjedését a szájüregben, csökkentve ezzel a fog lepedékek mennyiségét.

A baktérium telep sejtburjánzását és az ínszövetre való kiterjedését is meg lehet akadályozni enzimekkel szabályozva a lepedékszerkezetek kiterjedését vagy méretét. A találmány ezen készítmények előállítási módszereire is vonatkozik.

A periodontális, azaz fog körüli betegség az egyik legrégebbi és leggyakoribb emberi betegség. Az őskori emberi leletekben szemmel láthatóan megmarad és jelentkezik egyébként egészséges egyedeknél is. Manapság ez a periodontális betegség jelentős, világméretű egészségügyi problémát jelent. Maga a betegség a fogíny szélén felhalmozódott foglepedék eredményeként alakul ki. Két átfogó osztálya van a periodontális betegségnek, melyek nagyjából közelítik a kórtani fokozat vagy súlyosság mértékét: a fogínygyulladás (gingivitis) és a fog körüli szövetek gyulladása (periodontitis).

A fogínygyulladás az íny szélén lévő szövet gyulladása az ott felhalmozódott fog lepedék következtében. A gingivitisre legtöbb esetben a duzzadt, vörös és vérző fogínyszövet jellemző. Ennek kiterjedése és súlyossága jelzi a betegség előrehaladottságának mértékét. A periodontitis nemcsak a fogíny szélének gyulladásával jellemezhető, hanem a periodontális ínszalag kapcsolódásának megszűnésével, az fogmeder (alveolaris) csont veszteséggel és a hám kapcsolódás csökkenésével, az apicalis migráció következtében. E fiziológiai veszteségek patológiai következménye a periodontális zacskó kialakulása, mely megfertőződhet, és így a bakteriális beszivárgás forrásává válik a gazdaszövetbe. A meglévő gingivitis kifejezett lyukká való továbbfejlődése képezheti alapját a periodontitisnek.

A szakirodalom alapján ismeretes, hogy jelentős mikrobiológiai populáció kerül a gingivalis (íny) gyulladás helyeiről a subgingival (foghús alatti) zacskókba. Ismeretesek bizonyos azonosított és specifikus bakteriális szervezetek, melyek az emberi periodontitis kialakulásáért felelősek, bár más szervezetek is súlyosbíthatják a betegséget. Továbbá, klinikai vizsgálatok eredményei összefüggést mutatnak bizonyos mikrobiológiai fajok jelenléte és a periodontális betegség súlyosságának foka, illetve különböző fajtái között. Ok-okozati összefüggés van a baktérium törzs telepek széles fajtáját tartalmazó lepedék mennyiségének jelenléte és a periodontális betegség között. Ebből következően tehát a periodontális betegség kiterjedése és súlyossága megfékezhető a lepedék korlátozásával.



Mind a krónikus fogínygyulladásnak (gingivitisnek) és a krónikus periodontitisnek (fog körüli szövetek gyulladása) van két fontos tulajdonsága, mely szekvenciális rokonságuk kulcsa lehet. Mindkettő általában fájdalommentes egészen a betegség már igen előrehaladott szintjéig és a bakteriális lepedék abszolút feltétele mindkettő kórtanának mielőtt ez előrehaladottá válik és kifejezett periodontális betegség lép fel. Mivel vannak másodlagos és külső tényezők, melyek a betegség mértékét befolyásolják, a legfontosabb és egyetlen tényező, mely a kontrollálhatóság fő reményét nyújtja, a bakteriális lepedék és a periodontális betegség közötti összefüggés.

A betegség kezdetén a bakteriális lepedék felgyülemlik a fogíny szélén. A kórtan előrehaladásával a foghús (fogíny) és a periodontális (ín)szalag krónikus gyulladása jelentkezik, később pedig különböző íny-fog szerkezetek megrongálódása. A krónikus gyulladást súlyosbítja az ásványosodott, megkeményedett lepedékből képződő calculus (kő) a különböző szöveti határfelületeken és a periodontális zacskóban. A hámszövet vándorlása a gyulladt és üszkös területekre eláraszthatja a lepedék szerkezeteket, gennyesen váladekozó tályogot eredményezve. A periodontális betegség végső és legsúlyosabb fázisa a fogüreg (fogmeder) csont felszívódása és a fog végleges lepattogzása.

A lepedék bakteriális csoportosulások heterogén keverékének sűrű állományú (mátrixban való) lerakódása. Míg a bakteriális összetevők alkotják a lepedék 50-70 %-át, a mátrix elhalt sejtekből, a nyál glikoproteinjeiből és vészérumfehérjékből áll, melyek egy poliszacharid gerincre rakódnak rá. A lepedék gerincét alkotó poliszacharidokat maga a baktérium szintetizálja, saját telepe felépítésének egyik lépéseként. A lepedék az élő baktérium és a mátrix mellett tartalmaz még élelmiszer maradókat, néhány hámsejtet, fehérvérsejteket és további különböző összetevőket, melyek a gazdászövetből származnak, és annak aktivitásából erednek.

A lepedék képződésének és fejlődésének, vagy proliferációjának (burjánzásának) két szakasza van. Az első lépéshez szükséges egy nyál glikoproteinekből álló alaprég a fog felszínén, valamint a szájüreg lágy szövetén. Ez a nyálból származó bázikus szerves réteg eloszlik (felszívódik) a felszínen és egy sajátos

vékony héjat képez. Ez az oldhatatlan hártya szolgál az íny feletti lepedék alapjául. A második lépés a baktérium telep képződése egy, a vékony héjban lévő úttörő baktérium által. Amint a baktérium egy szerkezet felszínéhez kötődik, azzal összekapcsolódik, telepet képez és megkezdődik a lepedék kialakulása.

A különböző foglepedékekben több mint 100 eltérő baktérium törzs van. A baktérium fajták e változatosságát befolyásolja a táplálkozás, a nyál összetétele és bakteriális kölcsönhatások, hogy néhányat megemlítsünk. A lepedék elhelyezkedése a szájüregben, a beteg kora és szájápolásának általános mértéke mind szerepet játszik a periodontális betegség és a foglepedék kialakulásában és következményeiben. Tehát nem meglepő, hogy a lepedék, mely baktérium társulások heterogén gyűjteménye, hozzákapcsolódva a foghoz rengeteg biokémiai és fiziológiai következményt okoz. A két fő kóros állapot, mint következmény, a periodontális betegség és a fogszuvasodás.

Terápiás szerként az enzimek egyedülálló lehetőséget jelentenek. Bár néhány régebbi, enzimeket alkalmazó szájpatológiai kutatás azon a feltételezésen alapult, hogy ezek baktericid hatásúak a lepedékben található szervezetek telepeire, következésképpen „fertőtlenítőszerként” működnének. Azonban ez a megközelítés nem volt eredményes. Újabban kimutatták, hogy ha a szájban lévő hámsejteket proteázzal kezelik, megváltozik a bakteriális adhézió (tapadás); bár ez a kezelés eltorzíja az arányokat a különféle baktériumok populációja között. Sokkal ígéretesebb eredmények születtek, amikor a baktericid hatásról elterelődött a figyelem a lepedék keletkezésének megváltoztatására. Ez utóbbi eredmények megmutatkoznak in vitro és in vivo körülmények között, továbbá állatkísérletekben és emberi klinikai vizsgálatokban. Azonban ezek a próbálkozások sem feleltek meg a remélt gyógyászati hatékonyságnak, leginkább azért, mert a eredményes hatáshoz szükséges idő meghaladta a szájüregben lévő enzim tartózkodási (retenciós) idejét. Röviden, a nyál folyása, a szájüregben lévő egyéb folyadék és élelmiszer mozgása és a szokásos mechanikai kavarodás lecsökkentette az enzim(ek) retenciós idejét. Ezek a tényezők lerövidítették az enzimek tartózkodási idejét, ezzel a vártnál kisebb klinikai eredményességet okozva.

Az enzimek in vitro kipróbálásakor az enzim szájüregben való tartózkodási ideje nem volt fontos figyelembe veendő kérdés. Nincs arra utaló jel, hogy ezen in vitro vizsgálatok tervezésénél felismerték volna ezt a fontos változót. Azonban ezek az in vitro rendszerek bizonyították az enzimek aktivitását a plakkok csökkentésében és felfedtek más fontos tényezőket. Ezen tényezők közé tartozik, hogy: (1) valószínűleg több mint egy enzim lehet szükséges; (2) az enzim nagyobb specifikus aktivitása lehet szükséges; (3) egy sokkal megfelelőbb enzim lehet szükséges; vagy (4) az enzimek kombinációja sokkal hatásosabb lehet.

A plakk maga egy rendkívül komplex keveréke különböző összetevőknek, nevezetesen makromolekuláknak, élő és elhalt sejteknek (teljes baktérium és a gazdaszövet levált hámsejtjeinek), sejtdaraboknak és különféle egyéb kapcsolódó anyagoknak mind a gazdaszövetből, mind a baktériumflórából. Az úttörő munka a plakk kémiai szempontból való vizsgálatok a plakk szénhidrát vagy poliszacharid (PS) gerincére összpontosult. Ez egy ideális kiindulási hely, mert a PS gerinc nemcsak a plakk-mátrix szerkezeti elemeként szolgált, hanem a baktérium növekvő telepeinek szénhidrát éléskamrájául is. A PS kutatások legnagyobb része a glükánok szerkezetének és tulajdonságainak meghatározása körül központosul, jóllehet sok egyéb összetevő is alkotja a plakk keveréket. A korábbi fogászati kezelési kutatásokat leíró tudományos szakirodalmi ismertetésekben, beleértve az enzimeseket is, bizonyos sémák merültek fel. A plakk képződést befolyásoló enzimes kutatások legnagyobb része a fogszuvasodás megelőzésének jegyében folyt; habár jól ismert dolog, hogy a plakkképződés befolyásolása egy alapvető kérdés, mely kapcsolódik mind a fogszuvasodás megelőzéséhez, mind a periodontális betegség megelőzéséhez. A kutatások során végeztek baktériumölő hatású in vitro vizsgálatokat, állatokon végzett tanulmányokat és klinikai vizsgálatokat, beleértve az emberi kísérleteket. Továbbá a klinikai vizsgálatok legnagyobb része szájvizet alkalmazott, mely tartalmazza az enzimet, míg néhány tanulmány rágógumit használt e célra.

A 4,138,476 számú USA szabadalom (Simonson) kitanítást ad plakkot diszpergáló (elosztató) enzimekről, mint szájon át adható terápiás szerekről, melyeket molekulárisan átalakítottak. Glükánhidrolázt kapcsoltak foszfát hordozócsoporttal, megnövelve így az enzim affinitását a fogak felszínéhez. A módosított glükánhidroláz

enzim kovalens keresztkötéssel kapcsolódik a hordozóhoz, olyan reagáló szer, mint pl. az etil-kloroformiát jelenlétében, és így megnövekszik kötődési képessége a fog hidroxipatit komponenseihez.

Az 5,490,988 számú USA szabadalom (Beggs) utal a terápiás szerek célzott helyre való juttatásra. A szabadalom kitanítást ad egy igen specifikus eljárásra, melyben egy antitest darabja képes kötődni egy célzott helyhez, antigen-antitest kötéssel és a terápiás szer számára biztosítja, hogy kapcsolódjon az antitesthez egy olyan további peptiddel, melyet az antitesthez kötöttek. A termék összetevői tehát az antitest, a peptid és a terápiás szer.

Az enzimek kiértékelésére közölt klinikai protokollok vizsgálatai azt mutatják, hogy két oka volt annak, hogy a kiválasztott enzimek miért nem működtek teljesen az elvárásoknak megfelelően: a) az enzimek nem úgy voltak módosítva, hogy megnövelt időtartamig maradtak volna a szájüregben; és b) a szájöblítés különböző ideig tartott és a nap folyamán különböző megadott időpontokban végezték, megkülönböztetett figyelem nélkül arra, hogy az adagolás közvetlenül olyan időpontban történjen, amikor a szájüregben lévő aktivitás (nyelés, rágás és nyálképződés) korlátozott, mint például az alvás.

A TALÁLmány ÖSSZEFOGLALÁSA:

A találmányi gondolat alapja két megfontoláson nyugszik, és mindkettő szükséges a periodontális betegség megelőzésének sikeres kezeléséhez. Az első a szájüregben lévő plakk szerkezetek felépítésének és mennyiségének enzim szabályozása; a második az enzimek szájüregben való tartózkodási idejének jelentősége. Mindkét szempontot előtérbe kell helyezni a periodontális betegség megjelenésekor a hatásos kezelésében.

Az egyik szempontból jelen találmány oly módon módosít kiválasztott enzimeket, hogy azok képesek lesznek szabályozni a plakkokat vagy annak összetevőit. A enzimek kiválasztásánál előtérbe kerülnek azok, melyek specifikusan bontanak le

poliszacharidokat. Ezáltal a plakk-mátrix gerinc szerkezete szabályozható, a baktérium szelektív, vagy széles-spektrumú pusztítása nélkül, elkerülve ezzel bármilyen bakteriális egyensúly felborulását.

A találmány lehetővé teszi a burjánzó baktérium telepek szelektív szabályozását, és ezért célja inkább a megelőzés, mint a kezelés. A találmány nem függ a szájüregben lévő baktérium-ölő aktivitástól, mely megszünteti

- (a) a normál baktérium szervezetek potenciális egyensúlyának felborulását, például túlburjánzást, akár a szájüregben, akár máshol, távol elhelyezkedve a gazdaszövetben vagy a gazdaszöveten;
- (b) a gazdaszövet szisztematikus válaszait figyelembevevő követelményt, mely lehet immunológiai vagy mérgező;
- (c) a fogíny széle alá az aktív hatóanyagok szállításának szükségességét.

A hangsúly tehát a bakteriális adhézió (tapadáson) van, különösen a szájüregben.

A módosított enzim előnyösen egy kiválasztott „anchor” (horgony) molekulá(k)hoz kötődik, hogy megmaradjon a szájüregben. Az enzimek szájüregben való tartózkodási ideje leginkább úgy maximalizálható, hogy az enzimeket specifikus molekulákhoz kötik, melyek a szerkezetekhez tapadnak és biofilmeket létesítenek a szájüregben belül. Az enzim aktivitásának meg kell maradnia a kapcsolódás után. Fontos az is, hogy a kiválasztott enzim és a specifikus „anchor” molekulák közti kapcsolódás során ne sérüljön meg teljesen az enzimaktivitás, bár lehetséges, hogy kapcsolódás következtében csökkenhet az aktivitás. Mindazonáltal legalább egy minimális hatásos mennyiségű enzimaktivitásnak meg kell maradnia a kapcsolódás után.

Másik szempontból, a találmány tárgya egy olyan módszer, mely meghatározza annak mértékét, hogy a kiválasztott és módosított enzimek mennyire gátolják a szájban lévő bakteriális plakk növekedését egy in vitro vizsgálati rendszerben és in vivo. A kiválasztott enzimek, melyek megőrzik ezt az enzim aktivitást, az „anchor” molekulákhoz való kötődés illetve származékképzés után alkalmasak lesznek a plakk növekedés gátlására.

A találmány alkalmazható, de nem szükségszerűen szájöblítőként, melyet a lefekvés idején lehet alkalmazni. A szájöblítőben lévő módosított enzimek előnyösen megmaradnak a szájüregben az alatt az idő alatt, amíg a nyálképző- és mechanikai mozgás kis mértékű. Továbbá, a tartózkodási idő hossza (hattól nyolc óra alvási idő) egy megnövekedett időtartamot jelent a kezelésben alkalmazott enzimek számára ahhoz, hogy véghez vigyék a kívánt biokémiai reakciókat.

Ez a találmány felveti a fogászati plakkal kapcsolatos paradoxont: egyrészt patogénikus tényezők, mint a baktériumok és a plakk megmaradnak a szájüregben, de másrészt, nem könnyű a potenciális terápiás szerek, mint az enzimek visszatartása a szájüregben. Ez a paradoxon előnyként alkalmazható a fogászati plakk szabályozásában, amikor a kiválasztott enzimek adagolásával a baktérium azon specifikus jellemző vonását vesszük figyelembe, melynek köszönhetően a periodontális betegséget okozza, például a szájüreg felszínéhez való kötődési képességét. Ebben a találmányban kiemelkedő jelentőséget tulajdonítottunk annak a felismerésnek, hogy fontos és szükséges a plakkellenes (antiplakk) készítmény szájüregben való tartózkodási idejének megnövelése, hiszen csak a készítmény szájüregben való tartózkodási idejének megnövelésével érhető el, hogy képes legyen hatásosan megelőzni a plakk felépülését. Ahol a szájüregben az antiplakk készítmények csak egy nagyon rövid ideig tartózkodnak, ott értelemszerűen a hatásosságuk is nagyon korlátozott. Bakteriális pusztulás eléréséhez egy rövid tartózkodási idő is megfelelő lehet; viszont az új koncepció szerint, mely a baktérium telep növekedését elősegítő közeg szerkezeti felépítésének megváltoztatását és módosítását jelenti, egy hosszabb tartózkodási idő szükséges.

A korábbi kutatások a periodontális betegség visszaszorítására és megszüntetésére irányultak, legnagyobb részben közvetlenül a baktérium elpusztítását célozták; csak néhány kutatás célja volt a bakteriális környezet szabályozása. Jelen találmány megkísérli a baktérium telep növekedését szabályozni, megőrizve a szájüregben lévő különböző baktérium törzsek közti egyensúlyt. A plakk mennyiségének szabályozásával és az extracelluláris poliszacharid gerinc méretének

korlátozásával a baktérium telepek száma szabályozható. Ez a szabályozás valósítható meg az enzim készítményekkel és a találmány szerinti eljárással.

A RAJZOK RÖVID LEÍRÁSA

Az 1. ábrán egy találmány szerinti enzim-anchor komplex vázlatos rajza látható, hozzákapcsolódva a foghoz;

A 2. ábrán egy találmány szerinti enzim-anchor komplex vázlatos rajza látható, hozzákapcsolódva egy membránhoz, vagy a szájüregben lévő más felszínhez;

A 3. ábrán egy találmány szerinti, más felépítésű enzim-anchor komplex vázlatos rajza látható, amikor kapcsolódik a szájüreghez;

A 4. ábrán egy találmány szerinti enzim-anchor komplex vázlatos rajza látható, hozzákapcsolódva egy a szájüregben lévő baktérium telep mátrixhoz; és

Az 5. ábrán egy találmány szerinti enzim-anchor komplex vázlatos rajza látható, hozzákapcsolódva egy baktériumhoz a szájüregben lévő baktérium telep mátrixban.

RÉSZLETES LEÍRÁS

Jelen találmány célul tűzi ki a kiválasztott enzimek szájüregben való megtartását. Eltérően a szabad vagy naszcens (frissen képződő) enzimek fogkrémekben vagy szájvízben való alkalmazásától (ahol a hatás csak átmeneti), ezen enzimeknek hosszabb idő áll rendelkezésükre ahhoz, hogy a várt biokémiai reakcióikat végrehajtsák és jótékony hatásukat kifejtsék, mivel úgy módosították őket, hogy meg tudjanak maradni a szájüregben belül. Továbbá, a specifikus enzimeket előnyösen úgy választják ki, hogy mérgező hatásuk minimális legyen a baktériumokra, így megőrizhető a természetes bakteriális egyensúly és ugyanakkor nincsenek káros hatással más szükséges és védő biofilmekre, például a „felépült hártyára”.

Bizonyos poliszacharid bontó enzimek úgy módosíthatók, hogy képesek a szájüreg felületein és szerkezetein adszorbeálódni és megállítani a plakk-mátrix-szal összekapcsolódott burjánzó baktérium telepeket. Az enzimeket származékokká

alakították vagy „anchor” molekulákhoz kapcsolták. Az enzim-anchor komplex „anchor” része tud ezután a szájüreghez tapadni, meggátolva a plakk felépülését.

Felismerték, hogy a fogszuvasodás kialakulásában valószínűsíthetően szerepet játszik a *Streptococcus mutans* és a plakk. Ez a fogszuvasodást okozó baktérium szukrózt használ fel szubsztrátok termeléséhez, amely a szájüregben lévő teljes mikrobiális populáció anyagcseréjéhez szükséges. E szukrózt felhasználó anyagcsere végtermékei szerves savak, melyek beindítják a fogszuvasodás kialakulásának lépés sorozatát. Továbbá a *Streptococcus mutans* szukrózt használ fel a szájban lévő tenyészet telepeinek megnöveléséhez is, amikor komplex és vízben oldhatatlan poliszacharidokat termel a szukróz-függő szubsztrát készlet felhasználásával. Ugyanez a helyzet több más baktérium esetében, melyek fogászati plakk-kal alkotnak telepet.

Az oldhatatlan poliszacharid szerkezetek alkotják a kiterjedt baktérium telep gerincét, melyek amikor összekapcsolódnak, plakk formájában egy látható filmet alkotnak. Míg a poliszacharidok jelenléte nem feltétele az úttörő baktérium fogfelszínhez való tapadásának, a telepek képződéséhez és állandósulásához ezen oldhatatlan poliszacharidok szükségesek. Úgy tűnik, hogy a komplex poliszacharidok, oldhatatlan tulajdonságukból következően nem csak a kezdeti baktérium telep képződését és burjánzását okozzák, de meg is védhetik a baktériumot terápiás szerektől. Tehát jelen találmány alkalmazható olyan szerekekkel kapcsolatban is, melyek bakteriális pusztulást okoznak, akár specifikusan akár nem-specifikusan. Korlátozva és szabályozva az oldhatatlan poliszacharidok mennyiségét és végül a plakkból lévő bakteriális telepet, jótékony hatás érhető el a periodontális betegség megelőzésében és előrehaladásában. Ezen komplex, oldhatatlan poliszacharidok egyike a glükán. A glükán enzim lebontása tehát a jelen találmány egyik tárgya.

A találmány tárgya egy készítmény és módszer, bizonyos glükánt bontó enzimek rögzítésére a szájüreg felszínéhez és szerkezetéhez. Ez meggátolja a plakk felépülését, mely a periodontális betegség egyik szükséges bevezető lépése. A burjánzó baktérium telepek gátlásával megfelelően elkerülhető a különféle baktérium törzsek közt fennálló egyensúly vagy mikrobiológiai ökológia bármilyen eltorzulása. Általában véve,

kívánatos elkerülni a bakteriális tenyészet megváltoztatását az alkalmazkodó baktériumok túlburjánzásának lehetősége miatt, melyek patogénikusak lehetnek. A találmány szerinti készítmény igyekszik fenntartani a szájüregben lévő különféle baktérium törzsek közt fennálló természetes relatív arányokat. Mindazonáltal a baktérium bizonyos törzseinek abszolút száma legalábbis csökkeni fog, mivel ezek telepei kisebbek lesznek.

Egy, az enzim szájüregben való tartózkodásának időtartamát megnövelő mechanizmus kifejlesztése lehetőséget ad a klinikai hatékonyság megnövekedésére. E cél eléréséhez a hatékony enzimeknek hosszabban kell a szájüregben megmaradniuk, hogy várt hatásukat kifejtsek. A szájüregben lévő enzimek megnövelt tartózkodási ideje korlátozza a plakk képződést azáltal, hogy a plakk mátrix poliszacharid gerincének kialakulását szabályozza.

A találmány szerinti készítmény célja, hogy lehetővé tegyen hosszabb tartózkodási időt a szájüregben az enzim számára. E megközelítés szerint, a megfelelő enzim(ek)et módosítva és hozzákapcsolva egy „anchor” molekulához, az enzim-anchor komplex „anchor” része fog kapcsolódni a szájüreg alakzataihoz. Az anchor molekula úgy lesz specifikusan kiválasztva, hogy kötődjön, például létező plakkhoz vagy a fogat borító kialakult hártáéhoz. A hámszövet viszonylagosan gyors átalakulása miatt a szájüregen belüli nyálkás szövet réteg kevésbé alkalmas hely egy kötés kialakítására, mint akár a már létező plakk vagy hártya.

Egy készítményben három „anchor” molekulával kapcsolódik két enzim, melyek olyan enzimatis aktivitásúak, hogy hatékonyan szabályozzák a plakk szénhidrát szerkezet gerincét. A kapott hat enzim-anchor komplexet vizsgálták egy *in vitro* teszt rendszerben, mely nyálat tartalmazott (normál baktériumokat és sok glikoproteint), hogy megállapítható legyen a plakk szabályozó képességük és a plakkhoz kapcsolódva a túlburjánzást megállítsák és a plakk poliszacharid gerincének hidrolitikus hasítását okozzák. Ezeknek az enzim-anchor komplexeknek a klinikai hatékonyságát megbecsülik és szükségszerűen optimalizálják.

Hivatkozva a rajzok 1. és 2. ábráira, ezeken egy találmány szerinti enzim-anchor komplex vázlatos rajza látható. A rajzok vázlatos ábrázolások, nem méretarányosak és csak szemléltető célúak. Az 1. ábrán látható egy 10 fog és a 12 fog felszíne. A 12 fogfelszínen egy mátrixba ágyazott baktérium 14 telep kapcsolódik a 10 foghoz. A 12 fogfelszínhez kapcsolódik egy 16 anchor molekula is, mely lehet egy odatapadt peptid. Egy 18 rögzített enzim kapcsolódik a 16 anchor molekulához és a 16 anchor molekula, valamint a 18 rögzített enzim együttesen alkotják a 20 anchor-enzim komplexet. A 20 anchor-enzim komplex verseng a 14 baktérium teleppel a 10 fog 12 felszínéhez való kötődésért, lecsökkentve ezzel a lehetséges szubsztrát helyeket a 14 baktérium telep kapcsolódásához. Ráadásul és fontosságát kiemelve, a 18 enzim kifejti katalitikus hatását a 14 telepen, lebontva a plakk mátrixot és/vagy a poliszacharid gerincet. Az 1. ábrán a 22 mátrix vége látható a 18 enzim mellett. Továbbá a 20 anchor-enzim komplex jelentős tartózkodási ideje a 12 fogfelszínen több, mint átmeneti akadályt okoz a plakk mátrix és a 14 baktérium telep elburjánzásában.

A 2. ábrán a találmány másik megvalósulási formája látható. Ezen az ábrán az 1. ábrának megfelelő részek ugyanazokkal a számokkal vannak jelölve. A találmány 2. ábrán látható megvalósulási formáján a 12 fogfelszínen egy 24 hártya van, melyhez enzim kapcsolódik. A hártya, mely peptideket, fehérjéket és hasonló alkotókat tartalmaz, szolgáltathatja vagy képezheti az anchor, vagy az alkalmazott enzimhez korábban már hozzákapcsolt elkülönített anchor.

A 4. ábrán a baktérium 14 telep mátrix egy részlete látható, benne egyedi 44 baktériumokkal. Ezen az ábrán a 20 komplex anchor 16 molekulája a bakteriális mátrixhoz kapcsolódik és a mátrix 22 vége világosan látható. Az 5. ábrán a 20 komplex anchor 16 molekulája közvetlenül a 44 baktériumhoz kapcsolódik a 14 mátrixon belül.

E találmány az enzim-„anchor” komplexet kiegészíti olyan poliszacharid bontó enzimek beépítésével, melyek különböznek a glükán bontó vagy hidrolizáló enzimektől, így például fruktóz alapú poliszacharidokat bontó enzimekkel, melyek glikoproteineket hidrolizálnak. A komplex szintén kiegészíthető ligandum-alapú „anchor” molekulákkal, melyek utánózzák a baktérium külső sejtfelszínét, így közvetlenül versengő

kapcsolódást képeznek a baktérium és az „anchor” enzim komplexek között. Továbbá a komplex tartalmazhat receptor-alapú „anchor” molekulákat, melyek utánozzák a baktériumkötőhelyeket, így az „anchor-t tartalmazó” enzimek adszorbeálódhatnak a már a plakkhöz kötött baktérium felszínén. Végül, az anchor molekulák lehetnek polipeptidek is, melyek ismert módon tapadó molekulákként alkalmazhatók.

A potenciálisan megfelelő hidrolitikus enzimek tisztításával (poliszacharid hidrolázok, glikoprotein bontó enzimek) nagyobb specifikus aktivitás érhető el és a reakció specifikus típusára irányul a figyelem.

Ezek után elvégezhetők az enzim és az „anchor” molekulák közötti kötés mértékének vagy fokának meghatározására alkalmas eljárások is, meghatározva ezzel az enzim molekulához kapcsolódó „anchor” molekulák számát, mely megadja az enzim aktivitás és kötésfok legjobb kombinációját.

Elfogadható, hogy bármely olyan hatású enzim alkalmazható ebben a találmányban, mely csökkenti a bakteriális telepek képződését. Előnyösen alkalmazható az enzimek egy hidrolitikus működésű csoportja, vagy hidrolázok, mivel ezek különösen hatékonyak. Ez a csoport elősegíti olyan kémiai kötések hidrolízisét, melyek részeket kötnek össze és a hidrolízis reakciójának végbemenetele után elkülöníthető kémiai entitásként léteznek. E találmányban előnyösen alkalmazható enzimek a következők közül választhatók ki: észterázok – észter kötések hasító enzimek; glikolitikusan hasító enzimek – oligo- és poliszacharidok kötéseit hasító enzimek; éter kötést hasító enzimek; peptid kötést hasító enzimek, ahol a fehérjék a szubsztrátok (reagensek); szén-nitrogén kötést hasító enzimek, ahol a szubsztrát (reaktáns) nem fehérje; savanhidrid bontó enzimek; szén-szén kötést hasítók; halid kötést bontók; foszfor-nitrogén kötést bontók; kén-nitrogén kötést bontók; és szén-foszfor kötést bontók.

Anchor molekulák és alakzatok az enzimek szájüregben való rögzítéséhez választhatók számos különböző kategóriából, az alábbiak szerint:

A. fehérjék, fehérje fragmentumok és polipeptidek

a. természetben előforduló

- b. természetben előforduló, de módosított
 - c. szintetikus polipeptidek
 - i. természetes aminosavakat felhasználó
 - ii. szintetikus, természetben nem található aminosavakat, például D-aminosavakat, β -szubsztituált aminosavakat, alfa,alfa-diszubsztituált, stb. felhasználó
 - d. túlnyomó elektromos töltéssel rendelkezők
 - i. kationos (bázikus amino savak)
 - ii. anionos (savas amino savak)
 - iii. semleges (alifás amino savak)
 - e. a fentiek bármely kombinációja
- B. szacharidok és poliszacharidok
- a. természetben előforduló, például glükóz, mannóz, galaktóz, ramnóz, fukóz, fruktóz, szukróz, stb.
 - b. természetben előforduló amino cukrok, például glükózamin, galaktózamin, N-acetilglükózamin, N-acetilgalaktózamin, neuraminsav, szíálsav, stb.
 - c. szintetikus, és nem természetes szacharidok és amino cukrok
 - i. cukrok észterei, például cukor-szerves sav észterek, stb.
 - ii. kémiaiilag összekapcsolt cukrok és fehérjék/polipeptidek, például szintetikus glikoproteinek
- C. Glikoproteinek/proteoglikánok
- a. természetben előforduló, például elasztin, lektinek, stb.
 - b. szintetikus, például módosított, természetben előforduló glikoproteinek / proteoglikánok
- D. Glikolipidek
- a. természetben előforduló, például szfingomielin, cerebrozid, gangliozidok, stb.
 - b. szintetikus, például módosított, természetben előforduló glikol; lipidek, olyan kémiai eljárással kezelve, mint észterképzés, amidálás, vagy hasonló kémiai reakciókkal

- E. Lipoproteinek, például chylomicron, nagyon kis sűrűségű lipoproteinek (VLDL), kis sűrűségű lipoproteinek (LDL), nagy sűrűségű lipoproteinek (HDL), stb.
- F. Lipidek
 - a. nem-polárosak, természetes vagy szintetikus eredetűek, például trigliceridek, koleszterol vagy egyéb növényi vagy állati szterolok, stb.
 - b. poláros, természetes vagy szintetikus eredetűek, például foszfolipidek (foszfatidil szerin), stb.
- G. Sejt fragmentumok és kiürült sejtek – külső bakteriális vagy állati sejtfal vagy membrán szegmensek vagy részletek, melyek leképezik az élő vagy életképes bakteriális vagy állati sejteket azért, hogy a szájüregben belüli felülethez erősítsenek egy enzimet.
- H. Nem biológiai eredetű, polimer anyagok
 - a. homopolimerek, például polietilénlikol (PEG), stb.
 - b. kopolimerek, például sztirén-butadién polimerek, stb.

Az enzimek és az anchor molekulák közti kötések is sokfélék lehetnek. Ezek a kötések lehetnek kémiaiak, kemiszorpciósak, vagy kovalens kötések, beleértve: amid (peptid); észter; glikozid (cukor kötések); és/vagy éter. A kötések lehetnek fizikaiak, fiziszorpciósak, mint például: van der Waals kötések, beleértve a lipofilitást; töltés-töltés vonzóerők/kölcsönhatások, beleértve az elektrosztatikus kölcsönhatást; és/vagy hidrogén kötés, ezen felül hidrofilitás.

Az anchor-enzim komplex anchor része és a szájüregben lévő szubsztrát felülete közti kötések jellemzően ugyanazok, mint az előző paragrafusban felsoroltak. A rajzok közül a 3. ábrán látható egy 30 szubsztrát vázlatos ábrázolása, mely a szájüreg felülete, ahogyan például egy fog, egy létező plakk, egy lerakódás vagy nyálkás szövet és hozzákapcsolódik egy 32 anchor-enzim komplex. A 32 anchor-enzim komplexet egy 34 anchor rész és egy 36 enzim rész alkotja. Van egy anchor-felszín 38 határfelület a 32 komplex és a 30 szubsztrát között, és egy 40 anchor-enzim kapcsolat. Úgy tűnik, hogy nagyobb tendenciával alakul ki kémiai kötés a 36 enzim rész és a 34 anchor rész

között, míg a 32 anchor-enzim komplex 34 anchor része és a 30 szubsztrát közötti kötés inkább fizikai jellegű.

Az enzim és az anchor közötti kötés inkább kémiai jellegű. Az anchor-enzim komplex anchor részének kölcsönhatása pedig inkább fizikai jellegű.

Példa

A találmány egyik megvalósítási formája magában foglal két kiválasztott enzimet, melyekről ismert, hogy a fogászati plakk mátrixot alkotó poliszacharid gerincet lebontó aktivitással rendelkeznek. Két ilyen enzim:

- 1) α -Glükózidáz EC 3.2.1.20; [(1 $\rightarrow$ 3) glükánohidroláz].

Az α -Glükózidáz kereskedelmi forgalomban kapható. Míg az enzim nagyobb hatékonysággal bont α -1,-4 glükóz kötést, hidrolizál α -1,-2 és α -1,-3 kötéseket is. Szintén hidrolizál α -1,-6 kötéseket, de csak nagyon kis mértékben.

- 2) Dextranáz EC 3.2.1.11; [(1 $\rightarrow$ 6) 6-glükánohidroláz].

A Dextranáz is kapható kereskedelmi forgalomban. Ez az enzim α -1,-6 kötésű glükóz molekulákat hasít le poliszacharidokból.

Sok kutató jellemzi a glükán szerkezetet α -1,-3 és α -1,-6 kötésekkel. A glükánt már leírták α -1,-4 és α -1,-2 kötésekkel is. Szerkezeti szempontból, az α -1,-6 kötések adják a glükán hosszúságát és az α -1,-3, α -1,-4 és α -1,-2 kötések pedig a glükán elágazó szerkezetét. Még nem ismert az hogy, vajon a glükán molekula hossza vagy elágazó szerkezete fontos a bakteriális telepképződés szempontjából. Ez okból két, kereskedelmi forgalomban kapható enzimre esett a választás: az α -Glükózidázra, mely α -1,-4 és α -1,-2 és α -1,-3 kötéseket bont, tehát a glükán szerkezet elágazási pontjainál hasít és a Dextranázra, mely α -1,-6 kötéseket bont, tehát a molekulahosszt meghatározó kötéseknel hasít.

Ezek az enzimek külön-külön kapcsolódnak mindegyik „anchor” molekulával:

- 1) bázisos polipeptiddel, például Lys-Lys-Glu-Lys-Lys vagy valamely hasonló bázisos polipeptiddel; 2) egy savas polipeptiddel, például Glu-Glu-Lys-Glu-Glu vagy valamely hasonló savas polipeptiddel.

A teichoin savak és lipoteichoin savak fontos baktérium sejtfal alkotók a kötés kialakítás szempontjából. Ezek a komponensek foszfát észterekkel is összekapcsolódhatnak, mely anionos jelleget ad a baktérium sejt felülete külső részének. Így a kationos jellegű Lys-Lys-Glu-Lys-Lys „anchor” molekula vonzódik a bakteriális sejtfalhoz.

Mivel a rendelkezésre álló bizonyíték alapján a bakteriális sejt felület anionos jellegű, indokolt az a feltételezés, hogy a baktérium főként kationos jellegű plakk részeken létesít telepet. Valójában ha kationos jellegű területek vagy helyek vannak a plakkhoz kapcsolódva, a Glu-Glu-Lys-Glu-Glu anionos jellegű „anchor” molekula vonzódik a plakk kationos területéhez, mely nagyon előnyös lenne.

Továbbá vagy alternatívan, bármely más sűrűn összetömörült lipid molekula, úgymint a micellák szolgálhatnak akár szájüregben lévő szubsztrátként vagy anchor-ként, amelyhez az enzim-anchor komplex hozzákapcsolódik.

A töltés vonzások elve fontos szerepet kaphat a bakteriális kapcsolódás kialakulásában, mely alapján rögzíteni lehet kiválasztott enzimeket a szájüregben lévő különféle szerves alakzatokhoz. A plakk telepek képződése során a bakteriális tapadás más tényezőket is érint, nemcsak egyedül a töltés vonzást. Így specifikus fehérjék is felelősek lehetnek a szájban lévő baktérium poliszacharidhoz (glükán) és plakkhoz való kötődésében. Mindazonáltal a plakkban a bakteriális kötődést leíró jelenlegi mechanizmus nem zár ki egyéb kötési mechanizmusokat melyek szerint az enzimek specifikus „anchor” molekulákkal kapcsolódnak, és beletartoznának e találmányba.

E példában felsorolt enzimek és anchor molekulák hat enzimszármazékot eredményeznek, széles töltés-kötés képesség lehetőségével.

SZINTÉZIS

Az enzim-anchor komplexek származékainak szintézise során minden egyes „anchor” molekula két egyedi enzimmel kapcsolódik. A bázisos jellegű Lys-Lys-Glu-Lys-Lys polipeptid a Glu szabad karboxil csoportjával kapcsolódik a két enzimhez és van valamely kapcsolódás a polipeptid szén-terminálisán keresztül is. A savas Glu-Glu-Lys-Glu-Glu polipeptid a Lys szabad aminocsoportján keresztül kapcsolódik és van bizonyos kapcsolódás a polipeptid N-terminálisán keresztül is a két enzimhez.

A hat enzim származék reakciótermékeit oszlopkromatográfiával lehet tisztítani, molekulaméret szerinti kizárással. A tisztított, összekapcsolt enzimek vizsgálati eredményét összehasonlítva a nem módosított enzimekével megállapítható, hogy a kötés következtében történt-e bármiféle változás az enzim aktivitásban.

E példában szereplő hat anchor-enzim komplexet vagy más enzimek és anchor molekulák komplexeit a továbbiakban vizsgálhatják in vitro rendszerben a klinikai alkalmazás előtt. Bármely megfelelő vizsgálati eljárás alkalmazható, például Drake eljárása [Drake, D. R., Vsrkas, K., Cardenzana, A. és Srikantha, R. „Enhanced bactericidal activity of Arm and Hammer dental care.” Am. J. Dent. 8, 308-312 (1995)] vagy ennek egy változata.

A bázikus és savas polipeptidek melyek kereskedelmi forgalomban kaphatók, például Peptides International cégtől, Lousville, Kentucky a szilárd fázisú peptidszintézis több változatával is előállíthatók. A kiindulási anyagokat tisztítás nélkül lehet felhasználni; bár minden egyes kiindulási anyagokból félre kell tenni és szükség szerint előzetesen vizsgálni kell a tisztaságot, például nem várt reakció termékek leírásához stb.

Az enzimek melyek szintén kaphatók kereskedelmi forgalomban és alkalmazhatók tisztítás nélkül is, beszerezhetők a United States Biochemical cégtől, Cleveland, OH és a Worthington Biochemical cégtől, Freehold, NJ. Egyéb felhasználható enzimek, melyek kereskedelmi forgalomban nem kaphatók, standard eljárásokkal izolálhatók és tisztíthatók szövetekből, szervezetekből. Mindegyik enzimből félretett mintát kell vizsgálni, és ha szükséges, a tisztaságot meg kell határozni. Ezek a tisztasági

vizsgálatok fontosak lehetnek az in vitro kísérleti eredményektől függően. Ezek a vizsgálatok elvégezhetők az enzimekből félretett mintákkal.

Az enzim aktivitás mérését érdemes a származékképzés reakciója (kötés kialakítása) előtt és után is elvégezni és ez könnyen megvalósítható, például 4-nitrofenil- α -D-glükóz felhasználásával, egy standard mérési módszer szerint.

A bázisos jellegű Lys-Lys-Glu-Lys-Lys polipeptid mindegyik enzimhez hozzákapcsolható Williams (1981) módszerének egy változatával [Williams, A. és Ibrahim, I. A. „A mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleofiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-[dimethylaminopropyl]-carbodiimide (EDC).” J. Am. Chem. Soc. 103, 7090-7095 (1981)]. Ez az eljárás 1-ethyl-3-[dimethylaminopropyl]-carbodiimidet (EDC) használ kapcsolási szerként. A polipeptidben a Glu EDC-vel aktivált karboxil csoportja (és a polipeptid szén-terminusának karboxil csoportja is) az enzim szabad amino csoportjával kapcsolódik, kovalens amid kötést kialakítva.

A savas jellegű Glu-Glu-Lys-Glu-Glu polipeptid mindegyik enzimhez hozzákapcsolható O'Shannessy (1987) módszerének egy változatával [O'Shannessy, D. J. és Hofmann, W. L. „Coupling antibodies for site directed immobilization.” Biotech Appl. Biochem. 9, 488-496 (1987)]. Ebben az eljárásban a Lys szabad amino csoportja (és a polipeptid N-terminusának szabad aminocsoportja is) aldehiddé alakul és azután kapcsolódik az enzimek szabad aminocsoportjához.

Mindkét kapcsolási és származékképzési reakcióban, beleértve a polipeptid anchor molekulákat, melléktermékek széles skálája keletkezik; bár széles skálán fog mozogni a molekulák méretkülönbsége is (molekula súlyok), lehetővé téve ezzel tisztítási eljárás alkalmazását, például HPLC-t egy 3000 PW oszlopon, molekula méret szerinti elválasztás alapján.

Ezen elválasztási lépés célja a reakció „tisztítása”. A „tisztítás” ugyanis eltávolítja az el nem reagált polipeptid „anchor” molekulákat, az egymással elreagált „anchor”

molekulák polipeptid keverékét és az enzim-„anchor” komplexek kívánt termékeit. Szintén keletkezhet számos, kívánságnak megfelelő enzim-„anchor” komplex is, az enzimhez kapcsolódott „anchor” molekulák számától függően. Nem feltétlenül szükséges az enzim-„anchor” komplexeket külön frakciókba szedni az „anchor” molekulák számától függően; inkább érdemes az összes enzim-„anchor” komplexet együttesen vizsgálni és klinikai gyakorlatban alkalmazni. Mindazonáltal el lehet választani egymástól molekulánként az enzim-„anchor” komplex fajtákat, ahol ez szükséges.

Ahol kívánatos és szükséges, a tisztítási módszer validálható, az oszlop (HPLC) működési feltételeinek megadásával és beállításával. Minta futtatások lehetnek 1) csak az enzimmal; 2) csak az anchor molekulával; és 3) az enzim nélküli reakcióeleggyel. Retenciós idő/frakció szám megadható az egész fehérjére, meghatározott működési körülmények mellett, így elválaszthatók egymástól a szabad „anchor” molekulák, a reakció termékek az „anchor” molekulák között, szabad enzimek és enzimszármazékok vagy összekapcsolódott enzimek.

In Vitro vizsgálat

Klinikai alkalmazás előtt az előállított enzim-anchor komplexek hatékonyságát meg lehet határozni egy in vitro vizsgálatban. Egy ilyen vizsgálatot ismertetünk az alábbiakban.

A vizsgálat alanyait a nyáltermelés szerint és a *Streptococcus mutans* és az *Actinomyces viscosus* magas szintje szerint (telep számlálás) választják ki, melyek ismertén erős plakk-képző baktériumok. A kiválasztott populáció nyálképzése elősegíthető inert (élettelen) anyag rágásával, mint parafilm vagy carbowax. Az oltóanyag törzsoldata az összegyűjtött nyálból készül. Ez a törzsoldat a nyálminták és az azonosított törzsek (az összes minta 20-25 %-a) legnagyobb populációnak elegyítésével készül.

Ezután, a következő oldatokat kell elkészíteni:

- a) szukrózzal gazdagított húsleves
- b) 20 mg/ml klorhexidine pozitív kontrol oldat, ismert plakk-képző inhibitor.

- c) A két teszt-jellegű kontrol lehet nem módosított enzim, például „anchor” molekulák nélküli enzimek.
- d) A 8 kezelő oldat (6 vizsgálati oldat és 2 teszt-jellegű kontrol) készülhet a szukrózzal gazdagított húslevest oldószerként felhasználva, hozzáadva 10, 1.0, és 0.1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokat.

Eljárás

Steril üveglapokat helyezünk 50 ml-es teszt csövekbe, melyek 39 ml szukrózzal gazdagított húslevest tartalmaznak. A csöveket beoltjuk 1 ml oltóanyag törzsoldattal. 37°C-on, 5%-os CO₂ alatt, 24-től 48 óráig inkubáljuk a csöveket, amíg a plakk képződés szemmel láthatóan megjelenik. A lapokat eltávolítva, áttesszük adagoló oldatokba, melyek friss szukrózzal gazdagított húslevest tartalmaznak (39 ml, 50 ml teszt csőben) és hozzáadunk 1 ml megfelelő teszt oldatot. A adagoló oldat összetétele a következő lehet:

- 1) Nincs kezelési kontrol - szukrózzal gazdagított húsleves
- 2) Pozitív kontrol – 20 mg/ml klorhexidine
- 3) Kontrol kezelésekhez kapcsolva, 1A, 1B és 1C – 1.0 mg/ml „anchor”-mentes α -Glükózidáz
- 4) Kontrol kezelésekhez kapcsolva, 2A, 2B és 2C – 1.0 mg/ml „anchor”-mentes Dextranáz
- 5) Teszt kezelések, 2A, 2B és 2C (3 Dextranáz-„anchor”): 10, 1.0, és 0.1 mg/ml.
- 6) Teszt kezelések, 2A, 2B és 2C (3 Dextranáz-„anchor”): 10, 1.0, és 0.1 mg/ml.

Az üveglapok körülbelül egy órán át a megfelelő adagoló oldatokban maradnak. Abból kivéve egy tiszta szukrózzal gazdagított húslevesben mártogatva leöblítjük őket.

A lapokat ezután friss szukrózzal gazdagított húslevesbe helyezzük és a csöveket hasonló módon 24-től 48 óráig inkubáljuk. A plakk mennyiségét rögzítjük (lefényképezzük) minden egyes kezelés esetén és mindegyik lapon lévő plakkot leszedjük, megszáritjuk és lemérjük.

Mindkét enzim aktivitását meghatározzuk a származékképzés előtt és után, és ugyanígy a reakció "tisztítás" hatékonyságát is. Mindegyik vizsgálatot vizuálisan végezzük; mindegyik kezelésről fényképet készítünk (mindegyik kezelést háromszor megismételve, fényképpel), és mindegyik tesztben képződött plakk mennyiségét megmérjük.

Az enzimek, anchorok és a kötést létesítő módszerek és eljárások kiválasztásánál számos tényezőt figyelembe veszünk, hogy a leghatékonyabb enzim-anchor komplexeket kapjuk. Néhány ezek közül: Az enzimek és anchor molekulák kiválasztása mindig a legmegfelelőbb legyen a baktérium telep mátrixának szabályozása szempontjából. Több mint egy enzim lehet szükséges a plakk képződésben szerepet játszó poliszacharid gerinc kritikus korlátozásához.

E találmány lehetséges előnyei a következők: 1) nem szükséges baktericid aktivitás, 2) megmarad a szájüregen belüli természetes mikrobiológiai egyensúly, és 3) a káros hatások valószínűségét minimalizálja vagy megszünteti a gazdaszövetben a szájüregből eltávolított helyen.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Baktérium növekedést / telep képzést szabályozó készítmény, mely tartalmaz:
 - egy enzimet
 - egy anchor molekulát, mely az enzimhez kapcsolódva enzim-anchor komplexet képez, az anchor képes egy baktérium telephez közeli szubsztráthoz kapcsolódni,
 - azzal jellemezve, hogy a szubsztráthoz kapcsolódva a baktérium telepnél lévő enzim-anchor komplex retenciós ideje meghosszabbodik.
2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az enzim kiválasztása a szerint történik, hogy képes-e lebontani a mátrix telepet.
3. A 2. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a mátrix telep poliszacharidokat tartalmaz és az enzim kiválasztása a szerint történik, hogy képes-e lebontani a poliszacharidokat.
4. A 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekula képes a szájüregen belül bármely megfelelő szubsztráthoz kapcsolódni.
5. A 4. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekula a fog felszínéhez kapcsolódik.
6. A 4. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekula a fog felszínén lévő hártyához kapcsolódik.
7. A 4. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekula egy baktérium sejtfalához kapcsolódik.
8. A 4. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekula egy *ligandumra* alapozott molekula, melyet úgy terveztek, hogy utánozza a

baktérium sejtfelületének külsejét és ezzel versengő kötést képez a szájüreg felszíne, és a baktérium és az enzim-anchor komplex között.

9. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a szájüregben lévő felszín egy plakk mátrix.
10. A 7. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekula egy *receptorra alapozott* molekula, melyet úgy terveztek, hogy kapcsolódjon a baktérium kötőhelyeihez, úgy hogy az enzim-anchor komplex rátapadhasson a baktérium felületére.
11. A 3. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a poliszacharid glükán.
12. A 3. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a poliszacharid egy heterogén és komplex aggregátum és több különböző oligo- és poliszacharidok keveréke.
13. A 3. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a kiválasztott enzim egy hidrolitikus aktivitású hidroláz.
14. A 13. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az enzim a következő csoportból van kiválasztva:
észterázok, melyek észter kötéseket hasítanak; glikolitikus bontó enzimek, melyek oligo- és poliszacharidokban lévő kötéseket hasítanak; éter kötést bontó enzimek; peptid kötést bontó enzimek, ahol a fehérjék a szubsztrátok (reaktáns); szén-nitrogén kötést bontó enzimek, ahol nem egy fehérje a szubsztrát (reaktáns); szén-szén kötést bontó enzimek; halid kötést bontó enzimek; foszfor-nitrogén kötést bontó enzimek; kén-nitrogén kötést bontó enzimek; és szén-foszfor kötést bontó enzimek.

15. 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekula egy olyan fehérjékből, fehérje fragmentumokból és polipeptidekből álló csoportból van kiválasztva, mely az alábbi egy vagy több csoportba tartozik:
- a. természetben előforduló
 - b. természetben előforduló, de módosított
 - c. szintetikus polipeptidok
 - i. természetes aminosavakat felhasználó
 - ii. szintetikus, természetben nem található aminosavakat felhasználó, például D-aminosavakat, β -szubsztituált, alfa,alfa-diszubsztituált aminosavakat
 - d. túlnyomó elektromos töltéssel rendelkezők
 - iii. kationos (bázikus aminosavak)
 - iv. anionos (savas aminosavak)
 - e. a fentiek bármely kombinációja
16. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekulák szacharidok és oligoszacharidok, a szacharidok és oligoszacharidok a következő csoportból vannak kiválasztva:
- a. természetben előforduló, például glükóz, mannóz, galaktóz, ramnóz, fukóz, fruktóz, szukróz;
 - b. természetben előforduló amino cukrok, például glükózamin, galaktózamin, N-acetilglükózamin, N-acetilgalaktózamin, neuraminsav, szialinsav;
 - c. szintetikus, és nem természetes szacharidok és amino cukrok, például
 - i. cukrok észterei, például cukor-szerves sav észterek és
 - ii. kémiaiilag összekapcsolt cukrok és fehérjék/polipeptidok, és szintetikus glikoproteinek
17. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekulák glikoproteinek/proteoglikánok, melyek a következő csoportból vannak kiválasztva:
- a. természetben előforduló, például elasztin, lektinek,



- b. szintetikus, például módosított, természetben előforduló glikoproteinek / proteoglikánok
18. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekulák glikolipidek, melyek a következő csoportból vannak kiválasztva:
- a. természetben előforduló, például szfingomielin, cerebrozid, gangliozidok, és
 - b. szintetikus, vagy módosított, természetben előforduló glikol; lipidek, olyan kémiai eljárással kezelve, mint észterképzés, amidálás, vagy hasonló kémiai reakciók
19. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekulák lipoproteinek, melyek a következő csoportból vannak kiválasztva: chylomicron, nagyon kis sűrűségű lipoproteinek (VLDL), kis sűrűségű lipoproteinek (LDL), nagy sűrűségű lipoproteinek (HDL).
20. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekulák lipidek, melyek a következő csoportból vannak kiválasztva:
- a. nem-polárosak, természetes vagy szintetikus eredetűek, például trigliceridek, koleszterol vagy egyéb növényi vagy állati szterolok; és
 - b. poláros, természetes vagy szintetikus eredetűek, például foszfolipidek (foszfatidil szerin)
21. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekulák sejt fragmentumok és kiürült sejtek, külső bakteriális vagy állati sejtfal vagy membrán szegmensek vagy részletek, melyek leképezik az élő vagy életképes bakteriális vagy állati sejteket, azért, hogy a szájüregben belüli felülethez erősítsenek egy enzimet.
22. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekulák nem biológiai eredetű, polimer anyagok, melyek kopolimereket

tartalmazó csoportból vannak kiválasztva, mint például a sztirén-butadién polimerek.

23. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az enzim α -Glükózidáz.
24. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az enzim Dextranáz.
25. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekula egy bázikus polipeptid.
26. A 25. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a bázikus polipeptid Lys-Lys-Glu-Lys-Lys.
27. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anchor molekula egy savas polipeptid.
28. 27. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a savas polipeptid Glu-Glu-Lys-Glu-Glu.
29. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a szubsztrát micellákat tartalmaz.
30. Baktérium telep képződést szabályozó alkalmazási módszer, a következő lépések szerint:
anchor-enzim komplex képződése, ahol az enzimet a szerint választjuk ki, hogy képes legyen egy telep mátrix legalább részeire való lebontására, és egy anchor, mely kapcsolódva az enzimhez a komplex részét alkotja; és az anchor kiválasztásánál a szubsztráthoz való kapcsolódási képessége számít, amely által megnövekszik az enzim-anchor komplex retenciós ideje, szoros közelségben a mátrixhoz.

31. A 30. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a baktérium telep képződést szabályozzuk a szájüregen belül.
32. 31. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a telep mátrix egy plakk mátrix és a plakk mátrix poliszacharidokat tartalmaz.
33. Baktérium telepek túlburjánzását szabályozó készítmény előállítási eljárása, mely a következő eljárási lépéseket tartalmazza
egy enzimet kiválasztunk, azon képessége szerint, hogy képes legyen lebontani a baktérium telep megjelenésekor a szerkezeti elemeket;
egy anchor molekulát kiválasztunk, aszerint, hogy képes legyen kapcsolódni a kiválasztott enzimhez, úgy hogy az enzimnek megmaradjon hatékony enzimatis aktivitása a szerkezeti elemek lebontására, továbbá az anchor kiválasztásánál számít kapcsolódási képessége egy, a baktérium telephez közeli szubsztráthoz; és
az anchor és az enzim összekapcsoljuk, enzim-anchor komplex képződésével.
34. A 33. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a baktérium telepek túlburjánzását szabályozzuk a szájüregen belül.
35. Bakteriális plakk telep képződést szabályozó alkalmazási módszer a szájüregen belül azzal jellemezve, hogy egy specifikus plakk bontó enzim kapcsolódik egy anchorhoz, melyet a következő csoportból választunk ki: sejtfal, sejtfal fragmensek, sejt fragmensek és kiürült sejtek.

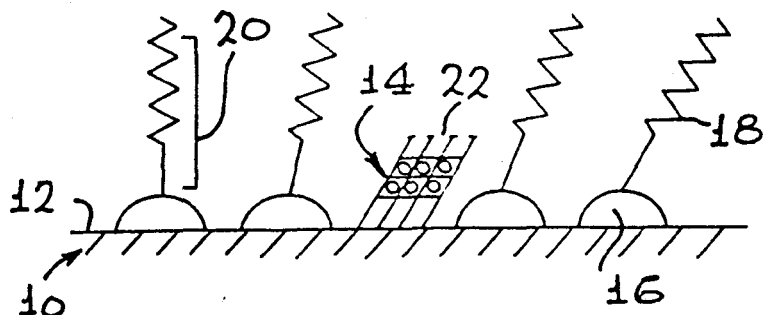
Ph 4 *28.11.2001*

2001. 02. 14.

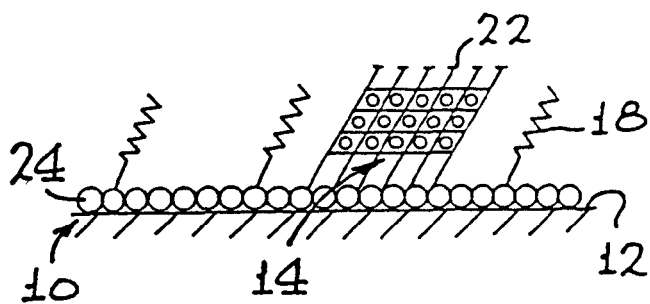
PINTZ GYÖRGY
old. gépész- és gazdasági mérnök
szabványügyi főosztály
iparjogi és szellemi tulajdon

Phy

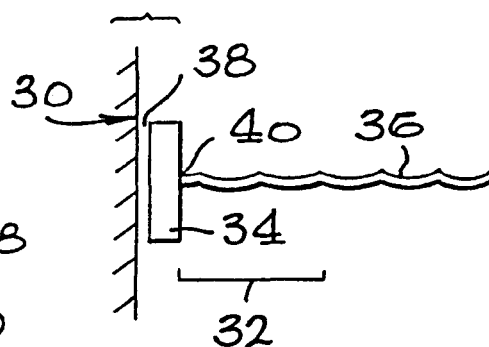
Magyar
ország
szellemi tulajdon
védelmi hivatala
Budapesti központ



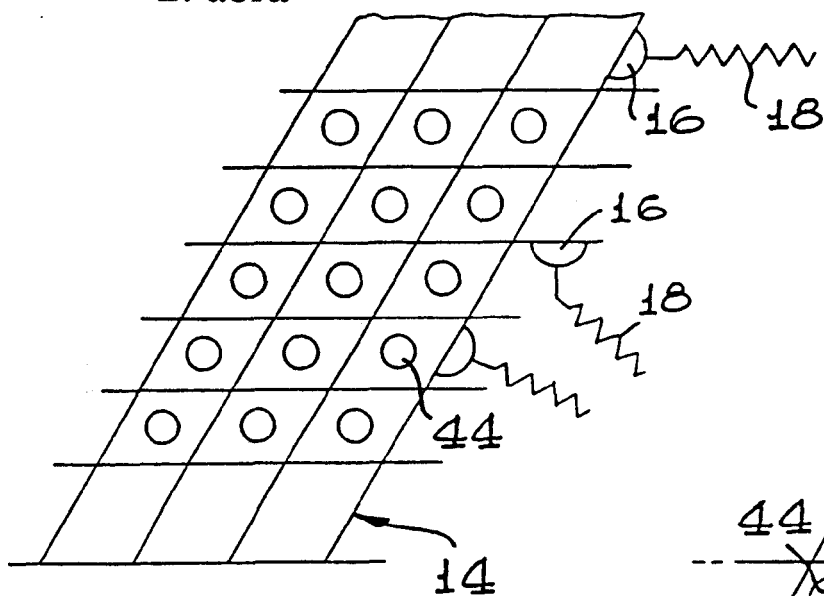
1. ábra



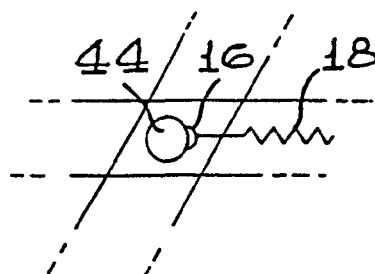
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra